

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50	A1	(11) 国際公開番号 WO00/34457 (43) 国際公開日 2000年6月15日(15.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06867 (22) 国際出願日 1999年12月8日(08.12.99) (30) 優先権データ 特願平10/351276 1998年12月10日(10.12.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 植田 隼(UEDA, Minoru)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西洪川2丁目12-1 ハーモバレス草津412号 Shiga, (JP) 岡本幸子(OKAMOTO, Sachiko)(JP/JP) 〒610-0121 京都府城陽市寺田今堀42-63 Kyoto, (JP) 尾崎 彩(OZAKI, Aya)(JP/JP) 〒520-0037 滋賀県大津市御陵町1-30 別所合同宿舎912 Shiga, (JP) 峰野純一(MINENO, Junichi)(JP/JP) 〒611-0002 京都府宇治市木幡南山15-78 Kyoto, (JP) 君塚房夫(KIMIZUKA, Fusao)(JP/JP) 〒523-0056 滋賀県近江八幡市古川町1500-20 Shiga, (JP)		浅田起代蔵(ASADA, Kiyozo)(JP/JP) 〒520-3333 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘3-20-9 Shiga, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP) (74) 代理人 青山 藻, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR IMMOBILIZING OLIGONUCLEOTIDE ON A CARRIER (54)発明の名称 オリゴヌクレオチドの担体への固定化方法 (57) Abstract A method for immobilizing an oligonucleotide on a carrier by spotting a buffer containing the oligonucleotide onto the carrier, characterized in that the oligonucleotide is immobilized on the carrier via a covalent bond.		

(57)要約

オリゴヌクレオチドを含有する緩衝液を担体上にスポットしてオリゴヌクレオチドを担体に固定化する方法であって、オリゴヌクレオチドを共有結合を介して担体に固定化することを特徴とするオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NI	オランダ		

明 細 書

オリゴヌクレオチドの担体への固定化方法

5 発明の分野

本発明は、DNAマイクロアレイ等の作製に有用な、固相担体へのオリゴヌクレオチドの固定化方法に関する。また、本発明は、該方法で固定化されたオリゴヌクレオチド固定化物、それを用いる標的核酸の検出方法にも関する。

10 発明の背景

ヒトをはじめとするゲノム解析プロジェクトの進展により、各種生物のゲノム構造が次第に解明されつつある。これと平行して、膨大なゲノム情報を医薬品の開発や健康の維持増進に役立てようとする、ゲノムの機能解析のための技術開発がすすめられている。その際の主要な技術として注目されているのがDNAチップ技術である。DNAチップは、スライドガラス等の固相担体に、多数の異なる遺伝子あるいはDNAの断片を整列させて固定化したマイクロアレイ（DNAアレイ）であり、遺伝子の発現解析や変異あるいは多型解析を飛躍的に加速させる手段として非常に有用である。

DNAチップを作製するためには、まず、DNAを担体に固定化する必要がある。そのDNAの固定化方法には大きく分けて2通りの方法が知られている。

一つの方法としては、担体上に共有結合したリンカーの先端でDNAを化学合成する方法で、例えば、サイエンス（Science）、第251巻、767～773頁（1991）およびヌクレイック・アシズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）第20巻、1679～1684（1992）に記載されている。この方法で固定できるDNAは、合成可能な配列既知のDNA（オリゴヌクレオチド）であり、通常の固相合成よりもステップ収率が低いといわれている。また、反応サイトを完全にシールするための微細装置が必要である。

もう一方の方法は、あらかじめ合成されたDNAやPCR（Polymerase Chain Reaction）で調製されたDNA（PCR増幅産物）を担体に共有結合させる方法

共有結合（静電結合）させる方法で、例えば、サイエンス（Science）、第270巻、467～470頁（1995）には非共有結合させる方法が、また、ヌクレック・アシズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）第22巻、5456～5465（1994）には共有結合させる方法が記載されている。これらの方法によれば、どのようなDNAでも固定することができるはずである。

しかしながら、例えば、非共有結合の場合、合成DNAのような短鎖DNA（オリゴヌクレオチド）は固定されにくい。また、PCR産物等の長鎖DNAを非共有結合で担体に固定化する場合においては、例えば、SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）やTE（トリス塩酸／EDTA）あるいはPBS（リン酸緩衝生理食塩水）等の塩溶液に溶解したDNAを変性処理した後、ポリリジンやポリエチレンジアミン等のポリ陽イオンでコートしたスライドガラス（担体）にスポットして固定するのが一般的である。この場合、その後の洗浄工程や標的核酸とのハイブリダイゼーションのステップで、かなりのDNAが担体から剥離することが知られている。この現象は、標的核酸の検出感度を減少させる要因となる。また、上記のヌクレック・アシズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）第22巻、5456～5465（1994）に記載された方法は、担体を非水系で処理する必要があり、簡便性に欠ける。

また、担体への固定化効率を高めるために、DNAをあらかじめ熱変性やアルカリ変性することが必要であり、変性操作がない場合、固定化効率が著しく低下することが知られている。さらに、この変性操作工程は、DNAチップ作製装置（アレイヤー）を用いて多数のDNA溶液を1枚のスライドに固定する際に、全工程を複雑にし、自動化の障害となっている。

DNA固定化の際に担体にスポットするDNA溶液の濃度は、高い方が固定化される絶対量は多くなる。しかし、担体への固定化率は低下し、使用するDNAの損失が多くなる。

また、単位面積あたりに多種類のDNAのドットが形成された高密度DNAアレイを作製する場合、DNAチップ作製装置（アレイヤー）が使用される。高密度DNAアレイの作製では、使用する機種によっては担体にスポットされるDNA溶液の量が極めて微量となり、DNA溶液が担体表面に拡散する前に乾燥し、

不均一なドットが形成される恐れがある。

一方、DNAアレイを用いて標的核酸を検出する場合、検出感度は単位面積当たり（ドット当たり）の固定化DNA量に依存するため、ドット当たりの固定化DNA量をいかにして多くするか、言い換えればDNAの固定化密度をいかに高くするかが非常に重要な課題となっている。さらに、いかにしてDNA溶液を均一に拡散させてスポットするかについても重要な課題となっている。

発明の目的

本発明の主な目的は、（１）オリゴヌクレオチドの固相担体への効果的な固定化方法、（２）該固定化方法により調製されたオリゴヌクレオチド固定化物、および（３）該固定化物を用いた標的核酸の検出方法を提供することにある。

発明の要旨

本発明者らは鋭意研究の結果、特定の濃度以上で、かつ少量のオリゴヌクレオチド溶液を担体にスポットして固定化を行うことにより、微少なドットとして固定化されたオリゴヌクレオチド固定化物においても目的の標的核酸が検出可能であることを見い出した。また、該方法で固定化されたオリゴヌクレオチドは容易に担体から剥離することがなく、安定なオリゴヌクレオチド固定化物が得られることを明らかにした。さらに該固定化物を使用して標的核酸を感度よく検出可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（１）オリゴヌクレオチドを含有する緩衝液を担体上にスポットしてオリゴヌクレオチドを担体に固定化する方法であって、オリゴヌクレオチドを共有結合を介して担体に固定化することを特徴とするオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

（２）官能基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする上記（１）記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

（３）末端に官能基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする上記（２）記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

(4) アミノ基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする上記(2)または(3)記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

(5) 官能基を保持する担体を使用することを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

5 (6) アルデヒド基を保持する担体を使用することを特徴とする上記(5)記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

(7) オリゴヌクレオチドと担体表面との間にスペーサーを保持させて固定化が行われることを特徴とする上記(1)～(6)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

10 (8) $1\ \mu\text{M}$ 以上の濃度のオリゴヌクレオチドを含有する緩衝液の $200\ \text{n l}$ 以下の量を担体にスポットすることを特徴とする上記(1)～(7)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

(9) 担体がガラス、石英およびそれらの表面処理物である上記(1)～(8)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

15 (10) モルホリン、モルホリン誘導体およびそれらの塩ならびに炭酸塩から選択される1種以上の物質を含有する緩衝液中で、オリゴヌクレオチドを担体と接触させる工程を包含することを特徴とする上記(1)～(9)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

20 (11) 緩衝液中のモルホリン、モルホリン誘導体およびそれらの塩ならびに炭酸塩からなる群から選択される1種以上を物質の濃度が、 $10\sim 500\ \text{mM}$ である上記(10)記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法、

(12) 上記(1)～(11)のいずれかに記載の固定化方法により調製したオリゴヌクレオチド固定化物、

25 (13) ドット当りに $1.25\ \text{fmol}$ 以上のオリゴヌクレオチドが固定化されていることを特徴とする上記(12)記載のオリゴヌクレオチド固定化物、

(14) 上記(12)または(13)記載のオリゴヌクレオチド固定化物を使用することを特徴とする標的核酸の検出方法、ならびに

(15) オリゴヌクレオチド固定化物と標的核酸をストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションさせる工程を包含することを特徴とする上記(14)

記載の標的核酸の検出方法

を提供するものである。

発明の詳細な説明

5 本明細書においてオリゴヌクレオチドとは比較的短鎖長の核酸を指し、特に限定するものではないが、6～100塩基の鎖長の核酸を意味し、好ましくは8～50塩基の鎖長の核酸が本発明に使用される。本発明のオリゴヌクレオチドはDNA、RNA、これらのキメラ分子、ならびにそれらの誘導体を包含する。これらのオリゴヌクレオチドは化学的あるいは酵素的に合成して作製することができ、
10 または、天然の核酸を化学的あるいは酵素的に処理して作製することができる。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、1本鎖でも2本鎖でもよいが、ハイブリダイゼーションへの使用を目的とする場合には、通常、1本鎖のオリゴヌクレオチドが使用される。

15 上記のオリゴヌクレオチド誘導体としては、たとえば、その分子中にイノシンや7-デアザグアノシンのような通常の核酸を構成するものとは異なるヌクレオチドを含むもの、リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたもの等の他、担体の表面への固定化のための修飾を付されたものが挙げられる。このような修飾には特に限定はないが、例えば、オリゴヌクレオチドにアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、エポキシ等の官能基が導入されたものが挙げ
20 られる。好適には、その末端に上記の官能基が導入されたオリゴヌクレオチドが本発明に使用される。アミノ基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することが特に好ましい。

25 本発明におけるオリゴヌクレオチドを固定化する担体は、実質的に不溶性の材料のものであれば特に限定はない。例えば、紙、ナイロン、セルロース、ニトロセルロースのようなセルロース誘導体、ポリカーボネート、ポリスチレンおよびポリプロピレンのようなプラスチックおよびプラスチック誘導体、磁性または非磁性金属、石英およびガラス等が包含される。また、これらの材料は、多孔性、滑らかな表面を有する重合および非重合性のものであってもよい。

しかし、本発明に使用される担体は、これらの材料に限定されるものではない。

担体は、DNAチップやバイオセンサーの担体として使用できるもののうち、固定化するオリゴヌクレオチドを担体の表面に保持できるものであればよく、例えば、担体の表面に親水性または疎水性の官能基、例えば、水酸基、アミン基、チオール基、アルデヒド基、カルボキシル基、エポキシ基、アシル基等を有しているものが好適に利用できる。アルデヒド基を保持する担体を使用することが特に好ましい。これらの官能基はそのまま、あるいは適当な誘導体として利用することができ、例えばカルボキシル基の場合にはN-ヒドロキシスクシニミドエステルのような活性化エステル誘導体として使用することができる。

また、上記担体には、担体の素材の特性として、該官能基がすでにその表面上に存在しているものも包含される。さらに、上記担体は担体の表面に親水性または疎水性の官能基がなくても、表面処理を行うことにより担体の表面に親水性または疎水性の官能基を有することができるものであれば特に限定されない。

このような表面処理物としては、例えば、ガラスまたは石英をアミノアルキルシラン等の市販のシランカップリング剤で処理したものや、ポリリジンやポリエチレンイミン等のポリ陽イオンで処理したもの、これらの処理担体をさらにグルタルアルデヒドやジイソチアン酸フェニル等で処理したもの等が挙げられる。また、上記のような官能基を導入したスライドガラスがシグマ社等から市販されている。

固定化されたオリゴヌクレオチドが標的核酸と効率よくハイブリダイズするように、オリゴヌクレオチドと担体との間にスペーサーを保持させて固定化を行うことができる。このようなスペーサーはオリゴヌクレオチドと担体との間にある程度の空間を提供するものであれば特に限定はなく、例えば標的核酸との相補性を有しない核酸（DNA、RNA）やアルキル鎖をスペーサーとして使用することができる。アルキル鎖をスペーサーとする場合、炭素数3以上、特に好ましくは炭素数6以上のアルキル鎖が使用される。

上記のスペーサーの導入方法には特に限定はなく、スペーサーを導入したオリゴヌクレオチドを担体への固定化に使用する方法、あらかじめ担体にスペーサーを導入した後にオリゴヌクレオチドを固定化する方法、スペーサーを保持するカップリング試薬を用いてオリゴヌクレオチドを担体に固定化する方法のいずれも

が使用できる。

以下に、本発明の担体へのオリゴヌクレオチドの固定化方法について具体的に説明する。

5 固定化したいオリゴヌクレオチドを適当な緩衝液に溶解し、オリゴヌクレオチド溶液を調製する。該緩衝液は所望により、中性塩および／または界面活性剤を含むものであってもよい。

10 本発明に使用される緩衝液には特に限定はなく、通常、核酸を溶解するために使用される各種の緩衝液を使用することができる。一般的には、緩衝液としてSSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）が用いられているが、例えばモルホリンあるいはモルホリン誘導体及びその塩、もしくは炭酸塩等を緩衝成分として含有する緩衝液が好適に使用できる。

15 モルホリン、モルホリン誘導体およびそれらの塩としては、特に限定するものではないが、例えば、モルホリン、炭素数1～3のアルキル基で置換されたN-アルキルモルホリン（例、N-メチルモルホリン、N-エチルモルホリン、N-プロピルモルホリン等）およびそれらの各種鉱酸（例、塩酸、炭酸等）、有機酸（例、酢酸、乳酸、クエン酸等）、脂肪酸（例、ラウリン酸、ステアリン酸等）等の塩が挙げられる。

20 また、炭酸塩も、特に限定するものではないが、炭酸のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、有機アミン塩、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウムおよび炭酸トリエチルアミン等が挙げられる。

これらの必須緩衝液成分は単独で、または2種以上を組み合わせ使用することができる。

25 固定化用緩衝液には、上記の必須緩衝液成分に加え、さらに他の塩、例えば、塩化ナトリウム等を共存させてもよい。また、緩衝液中に界面活性剤を共存させてもよい。用いる界面活性剤にも、特に限定はなく、共存させることによりオリゴヌクレオチド溶液の担体表面での均一な拡散を調節するものであればいずれでも好適に使用できる。

本発明に使用される固定化用緩衝液は、好ましくはpH7～11、さらに好ま

しくはpH8～10に調製される。また、該緩衝液の塩濃度は、好ましくは10 mM～500 mM、さらに好ましくは50～200 mMである。

DNAの固定化率の向上は、標的核酸の検出感度の向上に寄与するので、固定化効率の高いモルホリンあるいはモルホリン誘導体及びその塩、もしくは炭酸塩等を緩衝成分として含有する緩衝液を用いるのが好ましい。

多数のオリゴヌクレオチドについて標的核酸とのハイブリダイゼーションを同時に実施する目的のためには、担体の単位面積あたりにできるだけ多種類のオリゴヌクレオチドを固定化することが望ましい。この場合には、オリゴヌクレオチドの固定化された領域（ドット）の面積を極力小さく抑えるために、スポットするオリゴヌクレオチド溶液の量が制限される。また、固定化されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズした標的核酸に由来するシグナルはドットに固定化されているオリゴヌクレオチドの量に依存する。このため、効率よくハイブリダイゼーション・シグナルの検出を行うためには、小さいドットで、かつ十分な量のオリゴヌクレオチドを固定化する必要がある。

一方、一般に高濃度のオリゴヌクレオチドを含む溶液を担体への固定化操作に使用するほど固定化されるオリゴヌクレオチド量も多くなるが、通常、使用可能なオリゴヌクレオチド量には制約がある。

1つの実施態様において、本発明のオリゴヌクレオチドの固定化方法は、1 μ M以上の濃度のオリゴヌクレオチドを含有する緩衝液の200 n l以下の量を担体にスポットすることを特徴とする。こうして作製されたオリゴヌクレオチド固定化担体を使用することにより、多数のオリゴヌクレオチドを対象として、かつ高い感度で当該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする標的核酸を検出することができる。

DNAチップ作製装置等を使用して、高密度のドットを形成して固定化されたオリゴヌクレオチドアレイを作製する場合には、スポットされるオリゴヌクレオチド溶液の量がさらに少量となる。例えば、ジェネティック・マイクロシステムズ（Genetic MicroSystems, GMS）社製のGMS 417アレイヤー（GMS 417 Arrayer）を使用した場合には、担体にスポットされるオリゴヌクレオチド溶液の量は1 n l以下であるが、この場合にも100 μ M以上の濃度のオリゴヌクレ

オチド溶液がスポットされている場合には、十分な感度でハイブリダイズした標的核酸を検出することが可能である。

担体上に固定化することが望まれるオリゴヌクレオチドは、担体の種類やその固定化物の使用目的に応じた適切な濃度となるように緩衝液に溶解し、マイクロ
5 ピペットや微量分注器またはDNAチップ作製装置を用いて担体、例えば、スライドガラス等に一定量ずつスポットする。オリゴヌクレオチドがスポットされた担体は、例えば、保湿器中で1時間保持した後、紫外線を照射してオリゴヌクレオチドを架橋する。ついで、0.2%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）水溶液、その後、さらに蒸留水で洗浄し、乾燥させる。

10 オリゴヌクレオチド溶液をDNAチップ作製装置（アレイヤー）を用いて担体上にスポットすることにより、オリゴヌクレオチドが高密度に整列固定されたDNAチップ（オリゴヌクレオチドチップ）を作製することができる。アレイヤーとしては、均質な高密度アレイを再現性よく短時間に作製出来るものであれば、市販の装置を利用でき、例えば、GMS 417アレイヤーを使用することが
15 できる。当該装置を用いてスポットされるオリゴヌクレオチド溶液量は通常1nl未満であり、ドット間隔は通常300μm程度である。このような仕様のアレイヤーであれば、5000以下のオリゴヌクレオチドを1枚のスライドガラスに整列させることは容易である。

オリゴヌクレオチドは、その塩基部分に存在するアミノ基等を介して担体に結合
20 させることができる。また、担体への固定化のための修飾を付されたオリゴヌクレオチドは、その修飾の種類に応じた方法で担体に結合させることができる。

例えば、アミノ基を導入されたオリゴヌクレオチドの場合、アミノ基と反応性を有する官能基、例えばアルデヒド基やカルボキシル基等を表面に有する担体を使用することにより、該オリゴヌクレオチドを担体上に共有結合を介して固定化
25 することができる。このような官能基は公知方法により担体上に導入することができる。

アミノ基を導入されたオリゴヌクレオチドはグルタルアルデヒドやジチオシアン酸フェニルで処理された担体に固定化することができる。ジチオシアン酸フェニルによる処理は非水系での取扱いを要するが、グルタルアルデヒドでの処理は

簡便であり、本発明の固定化方法に好適である。担体としてグルタルアルデヒド処理されたスライドガラスを使用する場合には、まず当該スライドガラスにアミノ基を導入されたオリゴヌクレオチドを含む溶液をスポットし、アルデヒド基とアミノ基の間にシッフ塩基を形成させる。さらにこのスライドガラスを還元処理に付すことにより、シッフ塩基は安定なアミンに変換され、目的のオリゴヌクレオチドが強固に固定化されたスライドガラスを作製することができる。

アミノ基以外の修飾が付されたオリゴヌクレオチドも、それぞれの修飾に適した官能基を有する担体を選択することにより、公知の操作にしたがって共有結合を介して担体に固定化することができる。

上記の固定化方法により共有結合を介して固定化されたオリゴヌクレオチドは、洗浄やハイブリダイゼーションの段階でのオリゴヌクレオチドの剥離が少なく、安定した実験結果を得るために有用である。さらに、上記の固定化方法によりドット面積当たりもしくは単位面積当たりのオリゴヌクレオチド固定化率を向上させることができる。言い換えれば、単位面積当たりの固定化オリゴヌクレオチド密度も向上させることができる。つまり、上記方法で固定化したオリゴヌクレオチド担体を使用することによって、従来の方法と比較して、標的核酸の検出の際の感度を高めることができる。

担体へのオリゴヌクレオチドの固定化率は、あらかじめローダミンなどの蛍光物質で標識したオリゴヌクレオチドを用いて固定化操作を行い、担体上のドットの蛍光強度を蛍光イメージアナライザー、例えば、FMB I O II マルチ・ビュー（宝酒造社製）を用いて測定することにより評価することができる。上記固定化率は、下記の式1より算出することができる。

式1：

固定化率（％）＝100×（固定化および洗浄操作後の担体上のドットの蛍光強度）／（固定化操作直後のドットの蛍光強度）

固定化オリゴヌクレオチド密度は、例えば、下記に示す操作により求めることができる。あらかじめローダミンなどの蛍光物質で標識したオリゴヌクレオチド

を用いて固定化操作を行い、蛍光イメージアナライザー、例えば、FMB I O II マルチ・ビューを用いた測定により、オリゴヌクレオチドが固定されたドットの蛍光強度を測定することができる。さらに、使用した蛍光標識オリゴヌクレオチドの量と蛍光強度から作成された検量線を基に、該ドットに固定化されたオリゴヌクレオチドの量を算出することができる。

そして、例えば、上記の蛍光イメージアナライザーにより当該ドットの面積を測定すれば、単位面積当たりの固定化されたオリゴヌクレオチド量、すなわち、固定化DNA密度を求めることができる。

上記の別法としては、一定量のオリゴヌクレオチド溶液を本発明の固定化方法により担体にスポットし、その固定化率を求める。得られた固定化率とスポットしたオリゴヌクレオチド量から固定化されたオリゴヌクレオチド量が算出できる。一方、形成されたドットの面積については、例えば、顕微鏡等を用いて求めることができる。このようにして得られた固定化オリゴヌクレオチド量と面積からも固定化オリゴヌクレオチド密度を求めることができる。

本発明の範囲には、上記で得られたオリゴヌクレオチド固定化物も包含される。

上記のGMS 417アレイヤーを使用してオリゴヌクレオチドのスポットを行った場合、担体上にスポットされるオリゴヌクレオチド溶液の量はおよそ50～100 p l（ピコリットル）である。また、下記実施例にも示されるように、本発明のオリゴヌクレオチドの固定化法によれば25%以上の効率でオリゴヌクレオチドが固定化される。すなわち、上記アレイヤーを使用して100 μ Mの濃度のオリゴヌクレオチド溶液を担体にスポットした場合には、1つのドットに少なくとも1.25 f m o l e（フェントモル）のオリゴヌクレオチドが固定化された固定化物が作製される。このようなオリゴヌクレオチド固定化物を使用することにより、十分な感度で標的核酸の検出を行うことができる。

さらに、上記のGMS 417アレイヤーを使用した場合には、担体の単位面積当りに多数のオリゴヌクレオチドが固定化されたオリゴヌクレオチド固定化物、たとえば、担体上の1平方c mの面積中に36以上のドットが形成された高密度のオリゴヌクレオチドアレイを作製することができる。当該高密度オリゴヌクレオチドアレイは微量の標的核酸を検出することができ、限られた試料中の清いニ

解析等を行う上で有用である。上記の装置を使用した本発明の方法によれば、たとえば、1平方cmの面積中に100以上のドットを有する高密度オリゴヌクレオチドアレイが作製でき、好ましくは1平方cmの面積中に400以上のドットを有するものが作製でき、さらに好ましくは1平方cmの面積中に900以上のドットを有するものを作製することができる。

また、本発明には、該オリゴヌクレオチド固定化物を使用する標的核酸の検出方法も包含される。この方法を実施するには、該オリゴヌクレオチド固定化物と、標的核酸をストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションさせる。

本発明において、ストリンジентな条件とは、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル第2版 (Molecular cloning, A laboratory manual 2nd ed.)、第9、47～9、51頁 (1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行) に記載されているような条件のことを言う。例えば、オリゴヌクレオチドが固定化されたDNA固定化物と標的核酸の場合、特に標的核酸と固定化されたDNAがハイブリダイズする部分の塩基配列の長さによって変化するが、上記のハイブリダイズする部分の長さよりT_m値を算出し、そのT_m値より20～25℃低い温度で、適当な緩衝液、例えば6×SSCや6×SSPEのような高イオン強度の溶液中でハイブリダイゼーションを行うことを言う。通常、つぎの洗浄段階において、該T_m値より12～20℃低い温度で、洗浄用緩衝液の塩濃度を変えながら洗浄を行うことが好ましい。

標的核酸は、特に限定するものではない。例えば、任意の核酸を標的として、担体に固定化されたオリゴヌクレオチドの中から、当該標的核酸にハイブリダイズするものをスクリーニングすることができる。効率よくスクリーニングを行うためには、通常、適切な方法、例えば蛍光物質を使用して標識された標的核酸が使用される。標識された標的核酸を用いて上記のようなハイブリダイゼーション～洗浄操作を行った後、担体上の蛍光を測定することにより、担体上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズした標的核酸を検出、さらにはその量を定量することができる。

さらに、オリゴヌクレオチドが固定化されたDNAチップは、ハイブリダイゼーションに基づく塩基配列解析 (sequencing by hybridization: SBH) や遺

伝子の1塩基多形 (single nucleotide polymorphism: SNP) 解析に有用である。

以上のように、本発明のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法を用いることにより、標的核酸の検出感度を低下させることなく、担体の単位面積当たりのオリゴヌクレオチドのドット数を増加し、ドット当たりの固定化オリゴヌクレオチド量を向上し、さらに実験操作時のオリゴヌクレオチドの剥離を低減させることができる。また、該方法により提供されるオリゴヌクレオチド固定化物を使用することにより、効率よく、かつ高い検出感度で標的核酸を検出することができる。

実施例

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳細に説明する。なお、本発明は以下の実施例の範囲に限定されるものではない。

以下の実施例に示す各種試験用緩衝液は、以下のような組成で調製したものを所定の濃度に希釈して使用した。

20×SSC溶液：3M塩化ナトリウムを含む0.3Mクエン酸三ナトリウム溶液。TE緩衝液：1mMEDTAを含む10mMトリスー塩酸 (pH8.0)。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)：PBSタブレット (宝酒造社製) を使用して調製。500mM炭酸緩衝液：500mM炭酸ナトリウムおよび500mM炭酸水素ナトリウムの溶液を混合して所定のpHに調整。500mMモルホリン緩衝液：500mMN-メチルモルホリンを希塩酸で所定のpHに調整。50mMホウ酸緩衝液：50mM塩化カリウムを含む50mMホウ酸溶液を2N水酸化ナトリウムで所定のpHに調整。

実施例1

(1) オリゴヌクレオチドの固定化

配列番号1に示す塩基配列を有し、その5'末端にローダミンX (PEバイオシステムズ社製、以下、ROXと称す) を結合させたオリゴヌクレオチド (以下、ROXオリゴと称す) および5'末端に炭素数6のアルキル鎖 (C6) のアルキ

ルアミノリンカー（P E バイオシステムズ社製）を結合させ、さらに3'末端に
ロードミンXを結合させたオリゴヌクレオチドを（以下、R O X アミノオリゴと
称す）それぞれDNA合成機を用いて合成した。これらの合成DNAを10 μ M
となるように50 mM N-メチルモルホリン塩酸（NMM）緩衝液（pH 9.

5 5）および50 mM炭酸緩衝液（pH 9. 5）に溶解し、オリゴヌクレオチド溶
液を調製した。

一方、対照として、T E 緩衝液に溶解したオリゴヌクレオチドについても固定
化を検討した。

スライドガラスは、アミノアルキルシラン（A A S）コートしたもの（A A S
10 処理）（シグマ社製）、ならびにこのA A S コートスライドガラスをさらに2.
5 % グルタルアルデヒド（G A）水溶液に1時間浸漬した後、蒸留水で3回洗
浄し、風乾したもの（A A S + G A 処理）を用いた。

上記のオリゴヌクレオチド溶液の0. 2 μ lを上記のそれぞれのスライドグラ
スにスポットして風乾した後、スライドガラスを37°Cの保湿器内に1時間保持
15 した。次いでスライドガラスに60 mJの紫外線照射を行った後、コハク酸溶液
（5 gの無水コハク酸（ナカライテスク社製）を315 mlのN-メチル-2-
ピリドン（ナカライテスク社製）に溶解し、さらに0. 2 M ホウ酸緩衝液（p
H 8. 0）を35 ml加えたもの）に15分間浸漬処理することにより遊離アミ
ノ基をブロックした。最後にスライドガラスを0. 2 % S D S 溶液で2分間洗
20 浄し、さらに蒸留水で洗浄して室温乾燥させた。

グルタルアルデヒド処理したスライドガラスについては、さらに担体のアルデ
ヒド基とDNAのアミノ基とのあいだに形成されたシッフ塩基を安定なアミンに
還元するために、洗浄後のスライドガラスをさらに0. 25 %水素化ホウ素ナト
リウム（和光純薬社製）を含んだリン酸緩衝生理食塩水（P B S）-100 %エ
タノール混合（体積比3 : 1）溶液に5分間浸せきする工程を行なった後、上記
25 同様に洗浄乾燥した。

こうして作製された固定化オリゴヌクレオチドをストリンジェントなハイブリ
ダイゼーションの条件下におくために、スライドガラスのスポット領域に0.
2 %のS D Sを含む4 \times S S Cを滴下し、気泡が入らないようにカバーガラス

で覆った。その周囲をシールで密閉して37～40℃、2～6時間保持した後、シールをはずして0.1%のSDSを含む0.2×SSC溶液中で30分、ついで0.2×SSC溶液中で30分洗浄し乾燥した。

(2) 固定化オリゴヌクレオチドの定量

- 5 固定化操作直後の蛍光強度と、ハイブリダイゼーション条件下で処理した後の蛍光強度を、それぞれ蛍光イメージアナライザー FMBIO II マルチ・ビュー (FMBIO II Multi-View、宝酒造社製) で測定し、両者の蛍光強度の数値から固定化率を算出した。その結果を表1に示す。

10 表1

オリゴヌクレオチド溶解液	オリゴヌクレオチドの種類	スライドガラスの表面処理	固定化率 (%)
TE緩衝液	ROXオリゴ	AAS処理	0.7
		AAS+GA処理	1.4
	ROXアミノオリゴ	AAS処理	0.9
		AAS+GA処理	1.6
NMM緩衝液	ROXオリゴ	AAS処理	5.8
		AAS+GA処理	13.2
	ROXアミノオリゴ	AAS処理	19.1
		AAS+GA処理	65.6
炭酸緩衝液	ROXオリゴ	AAS処理	4.4
		AAS+GA処理	7.7
	ROXアミノオリゴ	AAS処理	16.6
		AAS+GA処理	25.7

- 表1に示すように、N-メチルモルホリン塩酸 (NMM) 緩衝液および炭酸緩衝液を使用した場合には5'末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (ROXアミノオリゴ) の固定化率が高くなることが示された。また、グルタルアルデヒド処理したAASスライドガラスを用いた場合の固定化率はさらに上昇した (AAS+GA処理)。一方、対照として使用したTE緩衝液では、固定化するオリゴヌクレオチドおよび担体の表面処理の種類にかかわらず、いずれも固定化率が低かった。
- 15

実施例 2

(1) オリゴヌクレオチドの固定化

配列表の配列番号 2 に塩基配列を示すヒトトランスフェリンレセプター遺伝子 (TFR) の塩基配列に由来するオリゴヌクレオチド TFR AS7 を合成し、その

5 5' 末端に C 1 2 のアルキルアミノリンカー (P E バイオシステムズ社製) を使用してアミノ基を付加した。このオリゴヌクレオチドについて、さらに 3' 末端に ROX 標識を付したもの (TFR AS7 3-ROX) と、5' 末端側のアミノ基を ROX に置き換えたもの (アミノ基を有していないもの、TFR AS7 5-ROX) の二通りの誘導体オリゴヌクレオチドを作製した。これらを 10、1 μ M となるように 10 0 mM 炭酸緩衝液 (pH 9. 5)、3 \times SSC および TE 緩衝液のそれぞれに溶解した。

AAS コートスライドガラスを実施例 1 の方法にしたがってグルタルアルデヒド処理し、活性化したものを準備した。各溶液 0. 2 μ l ずつをこれらのスライドガラスのそれぞれにスポットし、実施例 1 に記載の方法で固定化処理を行った。

15 なお、固定化処理は水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理を行ったもの (表 2 中、還元処理あり)、省略したもの (表 2 中、還元処理なし) の 2 通りで行い、さらに固定化処理後のスライドガラスについて 25 $^{\circ}$ C、95 $^{\circ}$ C の 2 通りでの水洗操作を行った。

20 (2) ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

(1) で作製されたスライドガラスについて、スライドガラス上に固定化された ROX に由来するシグナルを FMB IO II マルチ・ビューでスキャンニングして解析した。炭酸緩衝液、3 \times SSC および TE 緩衝液を用いて得られた結果をそれぞれ表 2 に示す。表中、- はシグナルが認められなかったことを、+ はシグナルが得られたことを示す。また、+ ~ 4 + はそれぞれシグナルの強さを示し、この順にシグナルが強くなることを表している。

25

a. 緩衝液

炭酸緩衝液、3 \times SSC、TE 緩衝液の順にオリゴヌクレオチドの固定化率が高いことが示された。特に TE 緩衝液を使用して 1 μ M のオリゴヌクレオチド

溶液をスポットした場合にはシグナルは得られず、当該緩衝液がオリゴヌクレオチドの固定化操作に適していないことが明らかとなった。

b. オリゴヌクレオチド

5 全般的に、5' 末端にアミノ化基を有するオリゴヌクレオチド (TFR AS7 3-ROX) を使用した場合の方が、アミノ基を有しないもの (TFR AS7 5-ROX) に比べて高い固定化効率が得られることが明らかになった。特に、還元処理を組み合わせた場合には炭酸緩衝液、3 × S S C のどちらを用いて固定化された場合も 25℃洗淨、95℃洗淨したもののシグナルに差がなく、安定にオリゴヌクレオチドが固定化されていることが示された。

10 以上のように、グルタルアルデヒド処理した A A S コートスライドガラスにオリゴヌクレオチドを固定化する場合には、水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理が有効であること、ならびに炭酸緩衝液を使用して固定化を行うことがよい結果につながることを示された。

表 2

炭酸緩衝液				
スライドガラス	オリゴヌクレオチド	洗浄温度 (℃)	オリゴヌクレオチド濃度	
			1 μM	10 μM
グルタルアルデヒド処理 AASコートスライド ガラス (還元処理あり)	TFR AS7 3-ROX	25	3+	4+
		95	3+	4+
	TFR AS7 5-ROX	25	+	2+
		95	+	2+
グルタルアルデヒド処理 AASコートスライド ガラス (還元処理なし)	TFR AS7 3-ROX	25	2+	3+
		95	+	2+
	TFR AS7 5-ROX	25	+	2+
		95	+	+
3×SSC				
スライドガラス	オリゴヌクレオチド	洗浄温度 (℃)	オリゴヌクレオチド濃度	
			1 μM	10 μM
グルタルアルデヒド処理 AASコートスライド ガラス (還元処理あり)	TFR AS7 3-ROX	25	+	2+
		95	+	2+
	TFR AS7 5-ROX	25	—	+
		95	—	+
グルタルアルデヒド処理 AASコートスライド ガラス (還元処理なし)	TFR AS7 3-ROX	25	+	2+
		95	—	+
	TFR AS7 5-ROX	25	—	+
		95	—	+
TE緩衝液				
スライドガラス	オリゴヌクレオチド	洗浄温度 (℃)	オリゴヌクレオチド濃度	
			1 μM	10 μM
グルタルアルデヒド処理 AASコートスライド ガラス (還元処理あり)	TFR AS7 3-ROX	25	—	+
		95	—	—
	TFR AS7 5-ROX	25	—	+
		95	—	—
グルタルアルデヒド処理 AASコートスライド ガラス (還元処理なし)	TFR AS7 3-ROX	25	—	+
		95	—	+
	TFR AS7 5-ROX	25	—	+
		95	—	—

実施例 3

(1) オリゴヌクレオチドの固定化

- 5 APS (アミノプロピルトリエトキシシラン) コートスライドガラス (松浪硝子工業社製) を実施例 1 の方法にしたがってグルタルアルデヒド処理し、活性化した。野生型のK-ras遺伝子、ならびに野生型K-rasタンパク質の61番目のアミノ酸GlnがLys、Glu、Arg、Pro、Leu、His (2種類) に変異したタンパク質

をコードする変異体K-ras遺伝子の塩基配列に対応する計8種のオリゴヌクレオチドc-K-ras/61Q（野生型）、c-K-ras/61K、c-K-ras/61E、c-K-ras/61R、c-K-ras/61P、c-K-ras/61L、c-K-ras/61H1、c-K-ras/61H2を合成した。合成された8種のオリゴヌクレオチドの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号3～10に示す。

5 配列番号4～10において、変異したコドンは10～12に位置する。また、ネガティブコントロールとしては実施例2において合成した上記のオリゴヌクレオチドTFR AS7（配列番号2）を使用した。なお、これらのオリゴヌクレオチドの5'末端にはC12のアルキル鎖を介してアミノ基を付加した。これらの各オリゴヌクレオチドをそれぞれ50 mM 炭酸緩衝液（pH 9.5）に溶解し、1 mM、
10 100 μ M、10 μ M、1 μ M（それぞれ6.6、0.66、0.066、0.0066 mg/mlに相当）のオリゴヌクレオチド濃度とした。各々の濃度のオリゴヌクレオチド溶液0.2 μ lずつを上記のスライドガラスにスポットし、実施例1と同様に固定化～紫外線照射～ブロッキング～水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理を行った。

15

（2）ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

ras Mutant Set c-Ki-ras codon 61（宝酒造社製）に含まれる8種類のテンプレートDNAのそれぞれを鋳型とし、ras Gene Primer Set c-Ki-ras/61（宝酒造社製）を使用したPCRを行い、増幅された128 bpのPCR産物を
20 CentriSepカラム（PEバイオシステムズ社製）で精製し、回収した。なお、リバースプライマーについてはROX標識したうえで使用した。こうして得られたROX標識PCR産物をプローブとして使用した。

上記の8種類のプローブをハイブリダイゼーション溶液（0.2%のSDSを含む4×SSC溶液）で各々3 μ Mに調製し、これを実施例2-（1）で作製したオリゴヌクレオチドが固定化されたスライドガラスに滴下し、カバーガラスで覆った。これらを50℃、2時間保湿器でインキュベーションした後、カバーガラスをはずして0.1%のSDSを含む0.2×SSC溶液で30分間、続いて0.2×SSC溶液で30分間、それぞれ25℃で洗浄した。

25

スライドガラスを乾燥後 EMRIQ II フルチ・ビューを使用し、アフライド

5 ガラス上のROXに由来する蛍光を検出し、各オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブの量を測定した。得られた結果のうち3つのプローブc-K-ras codon 61 AAA、c-K-ras codon 61 GAA、c-K-ras codon 61 CGA（それぞれ、オリゴヌクレオチドc-K-ras/61K、c-K-ras/61E、c-K-ras/61Rに対応する）について
10 の結果を表3に示す。表中、－はシグナルが認められなかったことを、＋はシグナルが得られたことを示す。また、＋～6＋はそれぞれシグナルの強さを示し、この順にシグナルが強くなることを表している。

10 表3に示されるように、どのプローブを使用した場合にも配列が100%一致したオリゴヌクレオチドのドットには強いシグナルが得られたのに対し、ミスマッチを含むドットには弱いシグナルしか得られていない。このように、上記のように作製されたオリゴヌクレオチド固定化物が標的核酸（プローブ）の塩基配列を判別可能であることが示された。また、スポットするオリゴヌクレオチドの濃度が高いほど強いシグナルが得られた。

表 3

プローブ	オリゴヌクレオチド	オリゴヌクレオチド濃度 (μ M)		
		10	100	1000
c-K-ras codon 61 AAA (c-K-ras/61Kに対応)	c-K-ras/61Q	+	2 +	3 +
	c-K-ras/61K	2 +	3 +	5 +
	c-K-ras/61E	+	2 +	3 +
	c-K-ras/61R	—	—	—
	c-K-ras/61P	—	—	—
	c-K-ras/61L	—	—	—
	c-K-ras/61H1	—	—	—
	c-K-ras/61H2	—	—	—
	TFR AS7	—	—	—
c-K-ras codon 61 GAA (c-K-ras/61Eに対応)	c-K-ras/61Q	+	+	+
	c-K-ras/61K	+	+	+
	c-K-ras/61E	3 +	5 +	6 +
	c-K-ras/61R	—	—	—
	c-K-ras/61P	—	—	—
	c-K-ras/61L	—	—	—
	c-K-ras/61H1	—	—	—
	c-K-ras/61H2	—	—	—
	TFR AS7	—	—	—
c-K-ras codon 61 CGA (c-K-ras/61Rに対応)	c-K-ras/61Q	—	—	+
	c-K-ras/61K	—	—	—
	c-K-ras/61E	—	—	—
	c-K-ras/61R	4 +	5 +	6 +
	c-K-ras/61P	—	—	—
	c-K-ras/61L	—	—	—
	c-K-ras/61H1	—	—	—
	c-K-ras/61H2	—	—	—
	TFR AS7	—	—	—

実施例 4

(1) オリゴヌクレオチドの固定化

- 5 APSコートスライドガラスと、これを実施例1の方法にしたがってグルタルアルデヒド処理し、活性化したものとを準備した。実施例3に使用されたオリゴヌクレオチドc-Ki-ras/61Q、c-Ki-ras/61K、TFR AS7（ネガティブコントロール）それぞれの1 mM～1 μ Mの溶液0.2 μ lずつを上記の2種のスライドガラスにスポットし、実施例1に記載の方法で固定化処理を行った。なお、グルタ

ルアルデヒド処理を行っていないAPSコートスライドグラスについては水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理を省略した。

(2) ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

5 ras Mutant Set c-Ki-ras codon 61のうち、c-Ki-ras codon 61 AAA（オリゴヌクレオチドc-K-ras/61Kに対応する）について実施例2と同様にPCRを実施し、ROX標識したDNAプローブを作製した。この2種類のプローブをそれぞれハイブリダイゼーション溶液（0.2%のSDSを含む4×SSC溶液）で各々2μMに調製して上記のオリゴヌクレオチドが固定化された上記のスライド
10 グラス上に滴下し、カバーグラスをした。これらを37℃、2時間、または50℃、2時間、それぞれ保湿器でインキュベーションした後、カバーグラスをはずして0.1%のSDSを含む0.2×SSC溶液で30分間、続いて0.2×SSC溶液で30分間、それぞれ25℃で洗浄した。スライドを乾燥後、スライド上のシグナルをFMBIO II マルチ・ビューでスキャンニングして解析
15 した。その結果を表4に示す。表中、－はシグナルが認められなかったことを、＋はシグナルが得られたことを示す。また、＋～5＋はそれぞれシグナルの強さを示し、この順にシグナルが強くなることを表している。

グルタルアルデヒド処理APSスライドグラスでは、固定化に使用されたオリゴヌクレオチドの濃度、ハイブリダイゼーションの温度にかかわらず100%一致した配列を有するプローブに特異的なシグナルが得られた（c-K-ras/61K）。
20 なお、シグナルの強度は使用したオリゴヌクレオチド濃度に依存的であるが、1μMのオリゴヌクレオチド溶液をスポットされたドットでも十分な強度のシグナルが得られ、かつマッチ、ミスマッチのプローブを判別することが可能であった。また、グルタルアルデヒド処理を行っていないスライドグラスではマッチ、ミスマッチのプローブで得られるシグナルの差がグルタルアルデヒド処理を行ったものに比べて小さくなった。この結果より、グルタルアルデヒド処理したスライド
25 グラスにオリゴヌクレオチドを固定化することにより、塩基配列に対する特異性の高いオリゴヌクレオチド固定化物が得られることが明らかとなった。

表 4

A P S コートスライドガラス					
ハイブリダイゼーション温度	オリゴヌクレオチド	オリゴヌクレオチド濃度 (μ M)			
		1	10	100	1000
37℃	c-K-ras/61Q	—	+	+	2+
	c-K-ras/61K	2+	2+	4+	4+
	TFR AS7	—	—	—	—
50℃	c-K-ras/61Q	+	+	2+	2+
	c-K-ras/61K	2+	2+	4+	4+
	TFR AS7	—	—	—	—
グルタルアルデヒド処理 A P S コートスライドガラス					
ハイブリダイゼーション温度	オリゴヌクレオチド	オリゴヌクレオチド濃度 (μ M)			
		1	10	100	1000
37℃	c-K-ras/61Q	+	+	2+	2+
	c-K-ras/61K	2+	3+	4+	5+
	TFR AS7	—	—	—	—
50℃	c-K-ras/61Q	—	—	+	+
	c-K-ras/61K	2+	3+	4+	5+
	TFR AS7	—	—	—	—

実施例 5

(1) オリゴヌクレオチドの固定化

- 5 実施例 3 に記載されたオリゴヌクレオチド c-Ki-ras/61Q、TFR AS7 (ネガティブコントロール) のそれぞれについて、5' 末端に付すアルキル鎖の鎖長を C 3、C 6、C 12 の 3 通りとし、さらに当該アルキル鎖の末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドの合成には P E バイオシステムズ社製のアルキルアミノリンカーを使用した。このオリゴヌクレオチドを 100、10、1 μ M となるように 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した。各溶液 0.2 μ l ずつを A P S コートスライドガラス、グルタルアルデヒド処理した A P S コートスライドガラスのそれぞれにスポットし、実施例 1 に記載の方法で固定化処理を行った。なお、グルタルアルデヒド処理を行っていない A P S コートスライドガラスについては水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理を省略した。
- 10
- 15

(2) ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

実施例3で使用したプローブ (c-K-ras codon 61 CAA ; オリゴヌクレオチドc-K-ras/61Qに対応する) をハイブリダイゼーション溶液 (0.2%のSDSを含む4×SSC溶液) に溶解して4、2 μMにそれぞれ調整した溶液を作製しこれを上記のスライドガラス上に滴下し、カバーガラスで覆った。このスライドガラスを37℃、2時間保湿器でインキュベーションした後、カバーガラスをはずして0.1%のSDSを含む0.2×SSC溶液で30分間、続いて0.2×SSC溶液で30分間、それぞれ25℃で洗浄した。スライドを乾燥後、スライド上のシグナルをFMBIO II マルチ・ビューでスキャンニングして解析した。その結果を表5に示す。表中、-はシグナルが認められなかったことを、+はシグナルが得られたことを示す。また、+~4+はそれぞれシグナルの強さを示し、この順にシグナルが強くなることを表している。

グルタルアルデヒド処理スライドガラスを使用した場合、オリゴヌクレオチドの末端とアミノ基の間のアルキル鎖 (スパーサー) が長いほど強いシグナルが得られた (C3<C6<C12)。また、同じ長さのアルキル鎖を有するオリゴヌクレオチド同士を比較すると、シグナルの強さは固定化操作に使用された溶液のオリゴヌクレオチド濃度に依存していた。一方、APSコートスライドガラスの場合にはアルキル鎖の鎖長とシグナル強度との間に明確な相関は認められなかった。さらに、同じオリゴヌクレオチド、緩衝液を使用した場合にはグルタルアルデヒド処理スライドガラスの方が強いシグナルが得られることが示された。

表 5

A P S コートスライドグラス					
プローブ (濃度)	オリゴヌクレオチド		オリゴヌクレオチド濃度 (μ M)		
			1	10	100
c-K-ras codon 61 CAA (4 μ M)	c-K-ras /61Q	C 3	+	+	+
		C 6	+	+	2 +
		C 1 2	+	+	2 +
	TFR AS7	C 3	—	—	—
		C 6	—	—	—
		C 1 2	—	—	—
c-K-ras codon 61 CAA (2 μ M)	c-K-ras /61Q	C 3	+	+	+
		C 6	+	+	2 +
		C 1 2	+	+	2 +
	TFR AS7	C 3	—	—	—
		C 6	—	—	—
		C 1 2	—	—	—
グルタルアルデヒド処理 A P S コートスライドグラス					
プローブ (濃度)	オリゴヌクレオチド		オリゴヌクレオチド濃度 (μ M)		
			1	10	100
c-K-ras codon 61 CAA (4 μ M)	c-K-ras /61Q	C 3	—	+	+
		C 6	+	+	2 +
		C 1 2	+	3 +	4 +
	TFR AS7	C 3	—	—	—
		C 6	—	—	—
		C 1 2	—	—	—
c-K-ras codon 61 CAA (2 μ M)	c-K-ras /61Q	C 3	+	+	+
		C 6	+	+	2 +
		C 1 2	+	2 +	3 +
	TFR AS7	C 3	—	—	—
		C 6	—	—	—
		C 1 2	—	—	—

実施例 6

(1) マイクロアレイの作製

- 5 実施例 3 で使用された 8 種類の K-ras61 オリゴヌクレオチド、ならびにネガティブコントロールであるオリゴヌクレオチド TFR AS7 の 1 mM、1 0 0 μ M 炭酸緩衝液溶液を、GMS 4 1 7 アレイヤー (ジェネティック・マイクロシステムズ社製) を用いてグルタルアルデヒド処理された A A S コートスライドガラスに

スポットした。これらのスライドガラスは実施例 1 に記載の方法で固定化処理を行った。

(2) ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

5 実施例 3 で作製された 8 種類の ROX 標識プローブを使用してハイブリダイゼーションを行った。プローブはそれぞれ $3 \mu\text{M}$ となるようにハイブリダイゼーション溶液 (0.2% の SDS を含む $4 \times \text{SSC}$ 溶液) に溶解し、上記のスライドガラス上に滴下してカバーガラスで覆った。このスライドガラスを 37°C 、4 時間保湿器でインキュベーションした後、カバーガラスをはずして 0.1% の SDS を含む $0.2 \times \text{SSC}$ 溶液で 30 分間、続いて $0.2 \times \text{SSC}$ 溶液で 30 分間、それぞれ 25°C で洗浄した。スライドを乾燥後、スライド上のシグナルを GMS 418 アレイスキャナー (ジェネティック・マイクロシステムズ社製) でスキャンニングして解析した。この結果のうち、プローブに c-K-ras codon 61 GAA、c-K-ras codon 61 CGA、c-K-ras codon 61 CAT (それぞれ、オリゴヌクレオチド c-K-ras/61E、c-K-ras/61R、c-K-ras/61HI に対応する) を用いた場合の結果を表 6 に示す。表中、- はシグナルが認められなかったことを、+ はシグナルが得られたことを示す。また、+ ~ 7 + はそれぞれシグナルの強さを示し、この順にシグナルが強くなることを表している。

20 いずれのプローブを使用した場合も配列が 100% 一致したオリゴヌクレオチドのドットで強いシグナルが得られ、ミスマッチのドットでは弱いシグナルしか得られなかった。スポットする際のオリゴヌクレオチド濃度が高いほど強いシグナルが得られているが、 $100 \mu\text{M}$ の溶液をスポットしたドットでもプローブの塩基配列のマッチ、ミスマッチを区別することは十分に可能であった。

表 6

プローブ	オリゴヌクレオチド	オリゴヌクレオチド濃度	
		100 μ M	1 mM
c-K-ras codon 61 GAA (c-K-ras/61Eに対応)	c-K-ras/61Q	3 +	4 +
	c-K-ras/61K	3 +	4 +
	c-K-ras/61E	5 +	7 +
	c-K-ras/61R	2 +	3 +
	c-K-ras/61P	2 +	3 +
	c-K-ras/61L	+	2 +
	c-K-ras/61H1	+	2 +
	c-K-ras/61H2	+	2 +
	TFR AS7	—	—
c-K-ras codon 61 CGA (c-K-ras/61Rに対応)	c-K-ras/61Q	2 +	3 +
	c-K-ras/61K	2 +	2 +
	c-K-ras/61E	2 +	2 +
	c-K-ras/61R	5 +	7 +
	c-K-ras/61P	3 +	4 +
	c-K-ras/61L	3 +	4 +
	c-K-ras/61H1	2 +	3 +
	c-K-ras/61H2	2 +	3 +
	TFR AS7	—	—
c-K-ras codon 61 CAT (c-K-ras/61H1に対応)	c-K-ras/61Q	2 +	3 +
	c-K-ras/61K	2 +	3 +
	c-K-ras/61E	2 +	3 +
	c-K-ras/61R	2 +	3 +
	c-K-ras/61P	2 +	3 +
	c-K-ras/61L	2 +	3 +
	c-K-ras/61H1	5 +	7 +
	c-K-ras/61H2	3 +	4 +
	TFR AS7	—	—

産業上の利用の可能性

- 5 DNAマイクロアレイ等の作製に有用な、固相担体へのオリゴヌクレオチドの固定化方法を提供する。また、この方法で固定化されたオリゴヌクレオチド固定化物、それを用いる標的核酸の検出方法も提供する。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 1: Designed oligonucleotide for testing

immobilization efficiency.

SEQ ID NO: 2: Designed oligonucleotide designated as TFR AS7 corresponding to a portion of human transferrin receptor (TFR) gene.

5 SEQ ID NO: 3: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61Q corresponding to a portion of wild type K-ras gene.

SEQ ID NO: 4: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61K corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

SEQ ID NO: 5: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61E corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

10 SEQ ID NO: 6: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61R corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

SEQ ID NO: 7: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61P corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

15 SEQ ID NO: 8: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61L corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

SEQ ID NO: 9: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61H1 corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

SEQ ID NO:10: Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61H2 corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

請求の範囲

1. オリゴヌクレオチドを含有する緩衝液を担体上にスポットしてオリゴヌクレオチドを担体に固定化する方法であって、オリゴヌクレオチドを共有結合を介して担体に固定化することを特徴とするオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

2. 官能基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする請求項1記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

3. 末端に官能基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする請求項2記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

4. アミノ基が導入されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする請求項2または3記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

5. 官能基を保持する担体を使用することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

6. アルデヒド基を保持する担体を使用することを特徴とする請求項5記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

7. オリゴヌクレオチドと担体表面との間にスペーサーを保持させて固定化が行われることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

8. $1\ \mu\text{M}$ 以上の濃度のオリゴヌクレオチドを含有する緩衝液の200n l以下の量を担体にスポットすることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

9. 担体がガラス、石英およびそれらの表面処理物である請求項1～8のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

10. モルホリン、モルホリン誘導体およびそれらの塩ならびに炭酸塩から選択される1種以上の物質を含有する緩衝液中で、オリゴヌクレオチドを担体と接触させる工程を包含することを特徴とする請求項1～9のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

11. 緩衝液中のモルホリン、モルホリン誘導体およびそれらの塩ならびに炭

酸塩からなる群から選択される１種以上を物質の濃度が、１０～５００ mMである請求項１０記載のオリゴヌクレオチドの担体への固定化方法。

１２．請求項１～１１のいずれか１項記載の固定化方法により調製したオリゴヌクレオチド固定化物。

５ １３．ドット当りに１．２５ fmole以上のオリゴヌクレオチドが固定化されていることを特徴とする請求項１２記載のオリゴヌクレオチド固定化物。

１４．請求項１２または１３記載のオリゴヌクレオチド固定化物を使用することを特徴とする標的核酸の検出方法。

１０ １５．オリゴヌクレオチド固定化物と標的核酸をストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションさせる工程を包含することを特徴とする請求項１４記載の標的核酸の検出方法。

1/5

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Method for immobilizing oligonucleotide onto carrier

<130> 661655

<150> JP 10-351276

<151> 1998-12-10

<160> 10

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide for testing immobilization efficiency.

<400> 1

caagctagat cagcattctc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

2/5

<223> Designed oligonucleotide designated as TFR AS7 corresponding to a portion of human transferrin receptor (TFR) gene.

<400> 2

tataccttta cctccaaaag

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61Q corresponding to a portion of wild type K-ras gene.

<400> 3

acagcaggtc aagaggagta

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61K corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400> 4

acagcaggta aagaggagta

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61E corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400> 5

acagcaggtg aagaggagta

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61R corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400> 6

acagcaggtc gagaggagta

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61P corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400>7

acagcaggtc cagaggagta

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61L corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400> 8

acagcaggtc tagaggagta

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61H1 corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400> 9

5/5

acagcaggtc atgaggagta

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide designated as c-K-ras/61H2 corresponding to a portion of mutant K-ras gene.

<400> 10

acagcaggtc acgaggagta

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06867

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Zhen Guo et al. "Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports" Nucleic Acids Research (1994) Vol.22, No.24, P.5456-5465	1-15
X	WO, 89/11548, A (Cetus Corporation), 30 November, 1989 (30.11.89) & EP, 451141, A & JP, 3-504328, A	1-15
PX	EP, 895082, A (Canon Inc.), 03 February, 1999 (03.02.99) & JP, 11-187900, A	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 February, 2000 (09.02.00)

Date of mailing of the international search report
15 February, 2000 (15.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Zhen Guo et al. "Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports" Nucleic Acids Research (1994) Vol. 22, No. 24, P. 5456-5465	1-15
X	WO, 89/11548, A (シタス コーポレイション) 30.11月. 1989 (30.11.89) & EP, 451141, A & JP, 3-504328, A	1-15
PX	EP, 895082, A (キャノン株式会社) 03.2月. 1999 (03.02.99) & JP, 11-187900, A	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.02.00

国際調査報告の発送日

15.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4 N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488